

UNIVERSITÉ DE PARIS

THÈSE POUR LE DOCTORAT

(MENTION MÉDECINE)

PRÉSENTÉE PAR

William Nersès TOPOUS KHAN

Né à Beyrouth, le 23 Janvier 1892.

Assistant et Chef de Laboratoire au Service de Chirurgie
de l'Hôpital Boucicaut et du Dispensaire l'Espérance,
Médecin de l'Institut Colonial,
Membre de la Société Anatomique
et de la Société de Médecine et d'Hygiène Tropicales.

TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

DU

TISSU OSSEUX

ÉTUDE COMPARÉE DES LIQUIDES DÉCALCIFIANTS

Président : M. Maurice LETULLE, Professeur.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1920

157

UNIVERSITÉ DE PARIS

THÈSE POUR LE DOCTORAT

(MENTION MÉDECINE)

157

PRÉSENTÉE PAR

William Nersès TOPOUS KHAN

Né à Beyrouth, le 23 Janvier 1892.

Assistant et Chef de Laboratoire au Service de Chirurgie
de l'Hôpital Boucicaut et du Dispensaire l'Espérance,
Médecin de l'Institut Colonial,
Membre de la Société Anatomique
et de la Société de Médecine et d'Hygiène Tropicales.

TECHNIQUE HISTOLOGIQUE

DU

TISSU OSSEUX

ÉTUDE COMPARÉE DES LIQUIDES DÉCALCIFIANTS



Président : M. Maurice LETULLE, Professeur.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

—
1920

Faculté de Médecine de Paris

LE DOYEN : M. ROGER

ASSESEUR M. POUCHET

PROFESSEURS MM.

Anatomie.	NICOLAS
Anatomie médico-chirurgicale.	CUNEO.
Physiologie.	Ch. RICHET
Physique médicale.	André BROCA
Chimie organique et Chimie générale.	DESGREZ
Bactériologie.	BESANÇON
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.	BRUMPT
Pathologie et Thérapeutique générales.	Marcel LABBÉ
Pathologie médicale.	W.
Pathologie chirurgicale.	N.
Anatomie pathologique.	LETULLE
Histologie.	PRENANT
Opérations et appareils.	DUVAL
Pharmacologie et matière médicale.	POUCHET
Thérapeutique.	CARNOT
Hygiène.	BERNARD
Médecine légale.	BALTHAZARD
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	MENETRIER
Pathologie expérimentale et comparée.	ROGER
Clinique médicale.	{ ACHARD
	{ WIDAL
	{ GILBERT
	{ CHAUFFARD
	{ MARFAN
	{ N.
Hygiène et clinique de la première enfance.	DUPRÉ
Clinique des maladies des enfants.	JEANSELME
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	P. MARIE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	TEISSIER
Clinique des maladies du système nerveux.	DELBET
Clinique des maladies contagieuses.	LEJARS
Clinique chirurgicale.	{ HARTMANN
	{ GOSSET
Clinique ophtalmologique.	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires.	LEGUEU
Clinique d'accouchements.	{ BAR
	{ COUVELAIRE
	{ BRINDEAU
Clinique gynécologique.	J. L. FAURE
Clinique chirurgicale infantile.	Aug. BROCA
Clinique thérapeutique.	VAQUEZ
Clinique oto-rhino laryngologique.	SEBILEAU.

Agrégés en exercice

MM.	GUENIOT	LERI	RICHAUD
ALGLAVE	GUILLAIN	LOEPER	ROUSSY
BRANCA	LABBÉ (HENRI)	MOCQUOT	ROUVIERE
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	MULON	SCHWARTZ
CASTAIGNE	LANGLOIS	NOBECOURT	SICARD
CHAMPY	LECENE	OKINCZYC	TANON
CHEVASSU	LEMIERRE	OMBREDANNE	TERRIEN
DESMAREST	LENORMANT	RATHERY	TIFFENEAU
GOUGEROT	LEQUEUX	RETTERER	VILLARET
GREGOIRE	LEREBoullet	RIBIERRE	ZIMMERN

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE
MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE LETULLE

Professeur d'Anatomie pathologique à la Faculté,
Médecin honoraire de l'hôpital Boucicaut,
Membre de l'Académie de Médecine.

A MON MAITRE
MONSIEUR LE PROFESSEUR E. BODIN
Professeur de Bactériologie à l'Université de Rennes,
Médecin de l'Hôtel-Dieu de Rennes.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE DOCTEUR CHARLES DUJARIER

Chirurgien de l'Hôpital Boucicaut,

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE DOCTEUR PAUL MATHIEU

Professeur agrégé à la Faculté,
Chirurgien des Hôpitaux.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.	6
PREMIÈRE PARTIE : Etude comparée des liquides décalcifiants. . .	7
Technique générale.	7
Liquides décalcifiants	8
— à base d'acide nitrique	9
— à base d'acide chlorhydrique	14
— à base d'acide sulfureux	17
Conclusions des expériences.	19
DEUXIÈME PARTIE : Notre technique histologique du tissu osseux.	20
Conclusions générales.	23
BIBLIOGRAPHIE	24

INTRODUCTION

Dans notre pratique de laboratoire nous sommes fréquemment appelés à faire l'examen histologique du tissu osseux. Les techniques de décalcification préconisées dans les traités classiques nous avaient donné des résultats très différents de ceux attendus. Ceci nous avait amené à étudier comparativement l'action des différents liquides décalcifiants sur l'os adulte. Ce sont ces essais qui sont exposés dans la première partie de cet ouvrage. Dans la seconde partie, nous exposons notre technique osseuse actuelle. L'expérience de cette histologie spéciale nous a permis de nous perfectionner et actuellement nous sommes arrivés à une technique générale, simple, facile, et peu coûteuse, donnant régulièrement des bonnes préparations.

PREMIÈRE PARTIE

**ÉTUDE COMPARÉE DES LIQUIDES
DÉCALCIFIANTS**

Le but de nos recherches était de déterminer la valeur comparée des différents acides communément employés comme décalcifiants. Nous avons préparé des coupes histologiques avec des pièces d'os semblables utilisant une technique uniforme et faisant seulement varier l'acide décalcifiant. La valeur de ces préparations déterminée à l'examen microscopique a été considérée comme un criterium de la qualité du liquide décalcifiant.

TECHNIQUE GÉNÉRALE.

Pièces. — Nous avons choisi comme matériel d'expérimentation de l'os compacte adulte pour nous mettre dans les conditions les moins favorables et ainsi d'obtenir des renseignements pratiques pouvant s'appliquer aux examens histo-pathologiques qui nous sont demandés journellement. Chez une femme âgée de 35 ans morte peu de temps après une fracture du crâne, nous avons réséqué le tiers moyen de la diaphyse cubitale qui, à ce niveau, est régulière et de grosseur uniforme presque sur toute son étendue, avec le périoste et un peu des parties molles y adhérentes.

Fixation. — Le fragment d'os entier a été laissé dans l'alcool à 95° pendant 24 heures. Le lendemain, les parties molles et le périoste étant suffisamment durcis, ce fragment a été débité en tranches perpendiculairement à l'axe de la diaphyse avec une scie à découper. Chacune des tranches ayant environ 3 millimètres d'épaisseur. Pour achever la fixation, ces pièces ont été remises dans l'alcool à 95° et laissées pendant 48 heures.

Décalcification. — Chacune de ces pièces a été suspendue dans un bain décalcifiant par un crin de Florence. Chaque bain contenait 50 centimètres cubes de liquide, qui était changé tous les jours jusqu'à la décalcification complète de la pièce. Le degré de la décalcification était déterminée par la facilité avec laquelle on pouvait enfoncer la pointe d'une aiguille dans l'os.

Lavage. — La pièce décalcifiée était lavée à l'eau courante pendant 24 heures.

Coupes. — Les pièces ont été coupées par congélation au microtome à l'acide carbonique. Nous avons préféré ce procédé parce qu'il altère le moins les tissus. Avec un peu d'habitude nous sommes arrivés à faire des coupes dont l'épaisseur variait entre 1/150^e et 1/100^e de millimètre.

Coloration. — Hemalun de Mayer et éosine hydroalcoolique.

LIQUIDES DÉCALCIFIANTS.

Les liquides décalcifiants sont des solutions d'acides qui forment avec les sels de chaux du tissu osseux des composés solubles qui abandonnent l'os et se dissolvent dans le liquide. Le bon liquide est celui qui décalcifie l'os rapidement sans altérer sa structure et sans léser les tissus environnants.

Pratiquement, les acides les plus employés sont l'acide nitrique et l'acide chlorhydrique, seuls ou avec l'adjonction des diverses substances correctives. L'acide picrique ayant une action très lente n'est propre que pour des pièces d'os jeune ou de très petit volume. Ordinairement, il n'est employé qu'en combinaison avec des acides plus forts.

Nos essais ont porté sur treize liquides décalcifiants dont sept à base d'acide nitrique, cinq à base d'acide chlorhydrique, et un à base d'acide sulfureux.

LIQUIDES A BASE D'ACIDE NITRIQUE.

L'acide nitrique employé doit être à 40° chimiquement pur, non fumant. Aussitôt la décalcification achevée, il faut sortir les pièces du liquide; autrement, elles jaunissent.

L'acide nitrique est de l'avis de beaucoup d'histologistes le meilleur décalcifiant. Il agit rapidement, ne produit pas de gonflements, et n'altère pas les éléments des tissus (Busch). Mais d'après Fish, l'acide nitrique exercerait facilement même dans les solutions faibles une action gélatinisante sur le tissu osseux. L'addition d'alcool ou d'alun servirait à ralentir cette action. Pour éviter le gonflement du collagène, Schaffer conseille d'éviter les solutions dont le titre descend au-dessous de 1,6 p. 100. Il emploie des solutions aqueuses simples, mais après décalcification, il laisse les fragments 24 heures dans une solution d'alun avant de les soumettre au lavage.

Expérience n° 1. — *Solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans l'eau distillée.*

Décalcification en 24 heures. La couleur et l'aspect de la pièce n'avaient pas changé.

Examen microscopique : Les noyaux bien colorés étaient peu rétractés dans leurs lacunes. Les lamelles osseuses présenteraient un aspect légèrement hyalin. Les parties molles étaient bien colorées quoiqu'un peu rattachées.

Busch se servait d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 10 p. 100 pour les os volumineux et durs, et d'une solution à 1 p. 100 pour les os jeunes (*Arch. f. mik. Anat.*, 1877, p. 481).

Expérience n° 2. -- *Solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique.*

Décalcification en 26 heures. La pièce était devenue jaune.

Examen microscopique : Les noyaux étaient plus vivement colorés que dans l'expérience n° 1. La substance fondamentale était moins altérée, mais on y trouvait de nombreux cristaux. Les globules rouges étant surchargés de couleur, donnaient aux capillaires un teint foncé opaque. Les parties molles étaient assez bien conservées, mais leur coloration était brutale et manquait de finesse.

La décoloration préalable des coupes à une solution saturée de carbonate de lithine dans l'alcool à 80° permit une meilleure coloration à l'hématéine-éosine, mais pas aussi bonne que dans l'expérience précédente.

Malassez employait une solution à 2 p. 100 d'acide nitrique dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique.

Expérience n° 3. — *Solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse saturée d'alun de potasse.*

Décalcification en 72 heures. La pièce était couverte de cristaux aciculés. Sa consistance était plus ferme que celle des expériences précédentes.

Examen microscopique : Les noyaux étaient bien colorés et presque sans rétraction. Sa structure lamellaire était bien respectée, sans gélatinisation. Les parties molles avaient conservé un aspect et une colorabilité normales.

En somme, l'adjonction d'alun a ralenti l'action de l'acide, mais elle a sauvé la structure des tissus.

Gage employait un liquide semblable; il allongeait la solution saturée d'alun de moitié d'eau (Fish in *Ref. Handb. Med. Sci.*, supp., p. 245).

Expérience n° 4. — *Solution aqueuse d'acide nitrique à 5 p. 100; après décalcification, solution aqueuse d'alun de potasse à 5 p. 100.*

Décalcification en 24 heures. Avant de soumettre la pièce au lavage, elle était mise dans un bain d'alun de potasse à 5 p. 100 pendant 24 heures. Ce passage avait raffermi la pièce.

Examen microscopique : Les coupes étaient inférieures à celles de l'expérience précédente, mais nettement meilleures que celles obtenues avec l'acide pur.

Schaffer se servait d'une solution d'acide nitrique de 2 à 15 p. 100. D'après lui, l'élimination de l'acide ne doit jamais se faire par immersion dans l'eau pure. Il passait les pièces dans la solution alunée avant de les soumettre au lavage pour prévenir le gonflement du collagène (Schaffer in *Encycl. mik. Tech.*, 2^e éd. Berlin, Urban et Schwarzenberg, 1910).

Expérience n° 5. — *Solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans l'alcool à 90°.*

Décalcification en 20 jours. La pièce était durcie et légèrement rétractée, mais facile à couper.

Examen microscopique : Les noyaux étaient moins bien colorés que dans les expériences précédentes. Les lamelles des systèmes de Havers étaient devenues granuleuses et avaient perdu leur architecture régulière. La substance fondamentale était craquelée. Les parties molles étaient ratatinées et avaient mal pris les colorants.

Mises à part les considérations d'ordre économique résultant de la quantité d'alcool consommée et son prix de revient, la lenteur extrême de son action et les pauvres résultats obtenus après plusieurs essais ont fait que nous avons abandonné ce liquide qui, à notre avis, jouit d'une réputation imméritée.

Ce liquide est préconisé par Mayer. Il admet que l'alcool nitrique agit beaucoup plus lentement que la solution aqueuse, mais, par contre, avait l'avantage de ne jamais produire d'altération ou de gonflement sur l'os préalablement bien fixé (P. Mayer et B. Lee, *Grundzüge mik, Techn.*, 4^e éd., Berlin, Friedlander, 1911).

Rousseau décalcifie dans un mélange d'acide nitrique de 15 à 40 p. 100 dans l'alcool, et enlève l'acide par l'alcool contenant du carbonate de chaux précipité (Rousseau, *Zeit. wiss. Mik.* XIV, 1897, p. 205).

Fish reconnaît l'utilité de l'alcool pour ralentir l'action gélatinisante de l'acide nitrique sur le tissu osseux. Il employait une solution à 3 p. 100 dans l'alcool à 70° (Fish, *loc. cit.*).

Vialleton préconise une solution de 3 à 7 p. 100

d'acide dans l'alcool à 70° et déclare que l'alcool nitrique lui a donné les meilleurs résultats pour la décalcification d'os adulte compact (Vialleton, *Précis de Tech. hist. et embryo.*, 2^e édit., 1909, O. Doin, Paris).

Expérience n° 6. — *Solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse de phloroglucine à 1 p. 100.*

Un gramme de phloroglucine est ajouté à 5 centimètres cubes d'acide nitrique pur. On chauffe très graduellement tout en agitant doucement. La solution vraisemblablement de nitrate de phloroglucine, prend une couleur rouge-rubis et dégage des vapeurs rouge-brun d'acide hyponitrique. Ce temps de la préparation doit être surveillé de près, car le mélange s'enflamme très facilement et on risque de se brûler. Les vapeurs dégagées sont très irritantes pour les muqueuses. On allonge cette solution de 100 centimètres cubes d'eau distillée.

Décalcification en 40 heures. La pièce était devenue rouge-brun et de consistance tout à fait molle.

Examen microscopique : La structure de l'os était très bien conservée ainsi que celle des parties molles. Par contre, la coloration des noyaux et du collagène était gênée.

Donc la phloroglucine avait retardé la décalcification, mais les tissus protégés contre l'action nuisible de l'acide. Si ce n'était la gêne apportée à la coloration, ce liquide nous aurait donné les meilleurs résultats.

Expérience n° 7. — *Solution d'acide nitrique à 20 p. 100 dans une solution aqueuse de phloroglucine à 1 p. 100.*

Le liquide est préparé de la même façon que dans

l'expérience précédente. La phloroglucine est dissoute dans la moitié de l'acide, l'autre moitié étant ajoutée après la dissolution dans l'eau. La quantité d'acide étant supérieure la phloroglucine se dissout plus aisément. Le teint du liquide obtenu est plus foncé.

Décalcification en 20 heures. La pièce était devenue couleur brique et avait une consistance très molle.

Examen microscopique : La substance fondamentale était dissociée, l'architecture de l'os bouleversée. Les noyaux étaient pâles. Tous les tissus avaient pris mal les colorants.

Comparant les coupes de ces deux dernières expériences, on reconnaît l'action néfaste de la solution forte de l'acide. Il est préférable d'employer des solutions faibles qui ont une action plus lente, mais qui donnent des résultats supérieurs.

Haug se servait de cette solution forte, et il attribuait à la phloroglucine un rôle protecteur sur les tissus contre l'action des acides minéraux de telle sorte que ceux-ci pouvaient être employés à des titres plus forts qu'on ne pourrait le faire sans cette adjonction (*Haug. Zeit. f. wiss Mik.*, VIII, I, 1891, p. 8).

LIQUIDES A BASE D'ACIDE CHLORHYDRIQUE.

D'après Busch, l'acide chlorhydrique est le réactif le plus employé pour la décalcification. Son avantage est d'être très rapide dans son action, mais il a l'inconvénient de causer des gonflements très sérieux dans les tissus. Pour parer à cet inconvénient, il propose l'adjonction d'alcool ou d'acide chromique. Von Ebener ajoute à la solution d'acide du chlorure de sodium. Waldayer le combine avec le chlorure de palladium.

Expérience n° 8. — *Solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 dans l'eau distillée.*

Décalcification en 20 heures.

Examen microscopique : Les noyaux étaient moins bien colorés que dans l'expérience n° 1. Les lamelles osseuses étaient gonflées et hyalines. Les parties molles étaient gonflées et mal colorées.

En comparant ces résultats avec ceux de l'expérience n° 1, dans laquelle on s'était servi d'acide nitrique au même titre, on trouve que la décalcification a été plus rapide, en revanche, les tissus ont été plus touchés qu'avec l'acide nitrique.

Ranvier se servait d'une solution à 50 p. 100 avec laquelle il obtenait des décalcifications extrêmement rapides.

Expérience n° 9. — *Solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique.*

Décalcification en 23 heures. La pièce était jaune.

Examen microscopique : Les coupes étaient meilleures que dans l'expérience précédente. Les mêmes critiques faites à la solution picro-nitrique sont applicables ici, mais les résultats étaient inférieurs à ceux obtenus dans l'expérience n° 2.

Expérience n° 10. — *Solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 15 p. 100.*

Décalcification en 70 heures.

Examen microscopique : L'adjonction du sel avait sensiblement corrigé les inconvénients de l'acide. La substance fondamentale était moins altérée et des parties molles plus respectées que dans l'expérience n° 8.

La durée de la décalcification était augmentée mais sa qualité améliorée par l'addition du sel. Ce fait se rapproche de l'action de l'alun dans les solutions nitriques.

Von Ebener employait une solution d'acide chlorhydrique de 1 à 3 p. 100 dans une solution de sel marin de 10 à 15 p. 100 (Von Ebener, cité par Vivante. *Intern. Montsschr.*, IX, 1892 p. 394; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893 p. 351).

Expérience n° 11. — *Solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 dans l'alcool à 90°.*

Décalcification en 9 jours. La pièce était dure, légèrement rétractée, mais facile à couper.

Examen microscopique : Les noyaux étaient assez bien colorés. La substance fondamentale était labourée de fissures, les lamelles granuleuses et fragmentées, les parties molles ratatinées.

Ainsi comme dans l'expérience n° 5 avec l'alcool nitrique, le ralentissement du processus décalcifiant déterminé par l'alcool n'a pas empêché l'acide de produire des dégâts dans les tissus, au contraire nous croyons que le contact prolongé de l'acide a joué une part importante dans leur production.

Bolles Lee recommande l'alcool chlorhydrique pour empêcher le gonflement des tissus au cours de la décalcification. (Bolles Lee et Henneguy, *Traité de technique d'Anat. micr.*, 3^e éd., 1902, O. Doin, Paris).

Expérience n° 12. — *Solution d'acide chlorhydrique à 5. 100 dans une solution aqueuse contenant 1 p. 100 de phloroglucine et 0,5 p. 100 de chlorure de sodium.*

Décalcification en 21 heures. La pièce avait pris une couleur carotte et avait une consistance molle.

Examen microscopique : Les noyaux étaient assez bien colorés et les parties molles bien conservées. La substance fondamentale était altérée cependant moins que dans les autres expériences à base d'acide chlorhydrique. Les coupes restent inférieures à celles obtenues avec la solution faible de phloroglucine nitrique.

Donc ici aussi nous retrouvons l'action protectrice de la phlocoglucine sur les éléments tissulaires.

Andeer recommandait la combinaison de la phloroglucine avec les solutions fortes d'acide chlorhydrique. (Andeer, *Centralbl. f. med. wiss.*, n°. 12, 33, p. 193, 579).

Haug également se servait des solutions fortes d'acide, mais il ajoutait avec la phloroglucine 0,5 p. 100 de chlorure de sodium (Haug, *loc. cit.*).

LIQUIDE A BASE D'ACIDE SULFUREUX.

On emploie l'acide sulfureux de commerce.

D'après Langeron, l'acide sulfureux est un excellent décalcifiant, presque aussi rapide que l'acide nitrique et moins nuisible au collagène que les mélanges à la phloroglucine (Langeron, *Précis de microscopie*, 2^e éd. p. 258, Paris, Masson, 1916).

L'action de l'acide sulfureux est basée sur la conversion du phosphate tricalcique insoluble dans l'eau en mono-phosphate très soluble. (Mann, *Physiological Histology*, Oxford, Clarendon, Press, 1902).

Expérience n° 13. — *Solution aqueuse d'acide sulfureux à 5 p. 100 à + 35° C.*

Décalcification en 10 jours. Dans les derniers jours, la pièce commençait à se craqueler. La pièce était dure et rétractée.

Examen microscopique. — Les coupes avaient mal pris les colorants. Le tissu osseux était profondément altéré, les lamelles étaient granuleuses et festonnées. Les parties molles étaient ratatinées et presque méconnaissables. C'est l'expérience qui nous a donné les résultats les moins satisfaisants.

C'est Ziegler qui a préconisé la méthode que nous avons essayée. (Ziegler, cité par Langeron, *loc. cit.*)

CONCLUSIONS DES EXPÉRIENCES

La meilleure décalcification est obtenue avec les liquides à base d'acide nitrique. Ceux-ci sont légèrement moins actifs que les liquides à base d'acide chlorhydrique, mais leur action gélatinisante sur le tissu osseux est moindre. L'acide sulfureux est un décalcifiant médiocre.

La combinaison d'acide picrique avec les acides nitrique ou chlorhydrique diminue légèrement leur activité; par contre, elle corrige leur action délétère sur les tissus. La gêne qu'il apporte à la coloration peut être diminuée par la décoloration au carbonate de lithine alcoolique.

L'adjonction d'alun à l'acide nitrique ainsi que de sel marin à l'acide chlorhydrique diminue la rapidité de la décalcification, mais raffermi le collagène contre l'action gélatinisante des acides.

L'alcool possède une action anti-gélatinisante sur le collagène, mais celui-ci est rendu granuleux et ratatiné par le contact prolongé des acides résultant de l'énorme ralentissement apporté à la décalcification.

La phloroglucine protège bien les tissus contre l'action destructeur des acides, pourvu que son titre ne descend pas au-dessous de 1 p. 5 d'acide. Son inconvénient est de diminuer la colorabilité des éléments.

Le liquide qui nous a donné les meilleurs résultats est une *solution d'acide nitrique à 5 p. 100 dans une solution aqueuse saturée d'alun de potasse* (alun : 1 part; eau : 10 parts),

DEUXIÈME PARTIE

NOTRE TECHNIQUE HISTOLOGIQUE DU TISSU OSSEUX

Prélèvement et fixation. — La partie à examiner est taillée grossièrement dans la pièce et mise dans le bain fixateur ; 24 heures après on donne au fragment ses dimensions définitives. Cette fixation préliminaire est très utile pour durcir les parties molles, autrement au moment de la section de l'os on risque de les décoller et embrouiller leurs rapports à l'os. L'os est taillé avec une scie à découper, les scies ordinaires créent des délabrements dans la surface de section. En matière d'histologie osseuse, il faut savoir être modeste : il ne faut pas chercher à obtenir d'aussi grandes coupes qu'avec les tissus mous. On ne peut pas donner des figures absolues, tout dépend de la dureté de l'os ; par exemple, on prendrait des fragments plus petits dans une pièce d'ostéite éburnée que dans une d'ostéite raréfiante. En général, il ne faut pas donner à la pièce plus de 15 millimètres de côté ; mais surtout l'épaisseur des pièces ne devra pas dépasser 5 millimètres. Pour obtenir des résultats précis, il est très important de bien préparer la surface de coupe d'avance. Les pièces définitives sont remises dans un nouveau bain fixateur.

Comme fixateur du tissu osseux nous avons essayé tour à tour l'alcool, le formol, les liquides de Bouin, de Zenker, de Dominici. Après de nombreux essais nous nous sommes définitivement ralliés au *formol*. C'est un

fixateur général qui ne gêne pas les colorations ultérieures. Son pouvoir et sa rapidité de pénétration sont considérables. Son emploi est simple ; on peut le procurer facilement, et son prix de revient est peu élevé. Mais ce qui est de grande importance pour le tissu osseux, c'est qu'il est le meilleur fixateur des hématies. Nous l'employons à 10 p. 100 (formol de commerce : 1 part ; eau : 3 parts). Les pièces sont laissées environ 5 jours dans ce bain, et à la sortie, sont soumises à un lavage de plusieurs heures dans l'eau courante.

Décalcification — Nous avons employé de nombreux liquides décalcifiants et obtenu des résultats très variables. Après une étude comparée de leur valeur, nous avons adopté le liquide nitrique aluné : un mélange de 5 p. 100 d'acide nitrique dans une solution saturée d'alun de potasse. C'est un liquide qui décalcifie rapidement tout en respectant la structure des tissus. Après son action, les noyaux aussi bien que le collagène restent parfaitement bien colorables. Les éléments qui entrent dans sa composition sont à la fois faciles à procurer et peu coûteux. Notre collègue, M. Eugène Normand, préparateur du Professeur Letulle emploie ce liquide et il en est fort satisfait.

Nous suspendons les fragments d'os dans le liquide au moyen des crins de Florence. Le liquide du bain doit être abondant et renouvelé tous les jours. Le progrès de la décalcification est mesuré par le degré de pénétration d'une aiguille dans l'os. On doit retirer les fragments dès que la décalcification est achevée.

Les pièces sont ensuite soumises à un lavage soigné de 24 à 48 heures dans l'eau courante pour éliminer l'acide et les sels. C'est un temps important qu'il ne faut pas négliger.

Nous avons remarqué qu'un séjour de quelques heures

dans une solution alcaline en neutralisant les traces d'acide qui puissent persister augmente l'affinité tinctoriale des éléments d'une façon appréciable. Nous employons une *solution aqueuse de carbonate de soude à 1 p. 1000*. On termine par un lavage rapide dans l'eau courante.

Inclusion et coupes. — La méthode à la celloïdine donne sans conteste les meilleures coupes. Un de ses avantages est de maintenir en place les parties qui tendent à se séparer, ce qui est particulièrement précieux pour le tissu osseux. Mais c'est une méthode délicate que nous réservons aux pièces d'études.

L'os décalcifié présente une résistance particulière à l'inclusion à la paraffine malgré les inconvénients du chauffage exigé par cette méthode qui ratatine les noyaux, durcit le collagène et disloque les tissus ; elle reste néanmoins la méthode la plus pratique. Ses inconvénients peuvent être réduits au minimum en diminuant la durée du séjour des pièces dans la paraffine à 55° par l'inclusion dans le vide qui augmente considérablement la pénétration de la paraffine. Nous employions ce dispositif au laboratoire de notre maître M. le Professeur E. Bodin et nous en étions très satisfaits.

Coloration. — Dans la pratique courante, nous nous servons de l'hémalun de Mayer (20 minutes) et de l'éosine en solution hydro-alcoolique étendue (24 heures). Dans des cas particuliers nécessitant des colorations de différenciation, nous employons le trichrome de P. Masson ou le Van Gieson ; mais la différenciation de l'os est longue et quand elle est obtenue, souvent les noyaux se trouvent complètement décolorés. Récemment nous avons obtenu des belles préparations au bleu polychrome de Unna avec différenciation à fond et contre-coloration à l'éosine-aurantia.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le liquide fixateur qui nous a donné les meilleurs résultats pour le tissu osseux est le formol à 10 p. 100 (formol de commerce : 1 part; eau : 3 parts). Les pièces y séjournent environ 5 jours.

Le liquide décalcifiant qui nous a donné les meilleurs résultats pour l'os adulte est un mélange de 5 p. 100 d'acide nitrique dans une solution aqueuse saturée d'alun de potasse. Le liquide doit être renouvelé quotidiennement jusqu'à la décalcification complète.

Après un lavage à l'eau courante de 24 à 48 heures les pièces sont passées dans un bain de carbonate de soude à 1 p. 1000 où elles séjournent quelques heures. On termine par un second lavage.

Vu : le Président,
M. LETULLE

Vu : le Doyen,
H. ROGER.

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie de Paris
APPELL

BIBLIOGRAPHIE

- Andeer.** — *Centralbl f. med. wiss.*, n° 12, 33, p. 193-579.
— *Intern. Monatsschr.*, I, p. 350.
— *Zeit f. wiss. Mik.*, 1885, p. 375, 539.
— *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 504.
- Busch.** — *Arch. f. mik Anat.*, 1877, p. 481.
- Fish.** — *Ref. Handb. Med. Sci., Supp.*, p. 425.
- Haug.** — *Zeit. f. wiss Mik.*, VIII, I, 1891. p. 8.
- Langeron.** — *Précis de microscopie*, 2^e éd., p. 256-258. Paris, Masson, 1916.
- Lee.** — *Microtometist's Vade-Mecum*, 5^e éd., London, Churchill.
- Lee et Henneguy.** — *Traité de Techniques d'Anat. microsc.* 3^e éd., p. 320-324, Paris, Doin, 1902.
- Lee et P. Mayer.** — *Grundzüge d. mik. Tech.*, 3^e éd., Berlin, Friedländer, 1907.
- Mann.** — *Physiological Histology*, Oxford, Clarendon Press., 1902.
- Rousseau.** — *Zeit. wiss Mik.*, XIV, 1897, p. 205.
- Schaffer.** — In *Encycl. d. mik. Tech.*, 2^e éd., Berlin, Urban et Schwarzenberg, 2 vol., 1910.
- Vialleton.** — *Précis de tech. histol. et embryo.*, 2^e éd., Paris, Doin, 1909.
- Vivante.** — *Intern. Monatsschr.* IX, 1892, p. 394.
— *Zeit. f. wiss Mik.* IX, 3, 1893, p. 351.

